저분자량의 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 항응고성

김공수† · 이지원 · 조석형*
충북대학교 공업화학과, *혜전대학 환경 · 의료재료 계열
(2003년 3월 14일 접수, 2003년 10월 27일 채택)

Anticoagulation Activities of Low Molecular Weight Sulfated Chitosan and Sulfated Sodium Alginate

Kong Soo Kim †, Ji Won Lee, and Suk Hyung Cho*
Department of Industrial and Engineering Chemistry, Chungbuk National University, CheongJu 360-763, Korea
**Division of Environment and Medical Materials, Hejeon Collige, Hongsung-up 350-800, Korea*
†*e-mail:kskim@cbucc.ac.kr*
(Received March 14, 2003;accepted October 27, 2003)

초록 : 저분자 키토산과 저분자 알진산 나트륨을 삼산화황-피리딘 복합체와 황산화 반응시켜 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨을 합성하였다. 황산화 반응에서 삼산화황-피리딘 복합체/다당류의 무게비율이 1:5일 때 황산화도가 각각 2.75와 2.53으로 가장 큰 값을 나타내었다. 합성한 황산화 키토산 및 황산화 알진산의 혈액에 대한 항응고 효과 및 활성트롬보 플라스틴 측정 시험을 행한 결과 분자량이 8.0 $\times 10^3$ Da일 때 항응고 효과가 가장 우수하였고 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨을 무게비율 1:1로 혼합하였을 때 헤파린에 비하여 91% 정도로 항응고 활성이 가장 좋았다. 활성트롬보 플라스틴 측정 시험에서도 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 무게비율이 1:1일 경우에 항응고 활성이 헤파린에 비하여 84%로 가장 좋았다.

ABSTRACT : Sulfated chitosan and sulfated sodium alginate were synthesized by sulfating reaction of low molecular chitosan and low molecular sodium alginate with SO_3-pyridine complex. When the weight ratio of SO_3-pyridine complex to polysaccharide was 1:5, the degrees of sulfation were the highest at 2.75 and 2.53 respectively. The anticoagulation effect was the highest when the molecular weight was 8.0×10^3 Da, and the anticoagulation activity was the highest at 91% of that of heparin when sulfated chitosan and sulfated sodium alginate were mixed at a weight ratio of 1:1. The anticoagulation activity was highest at 84% of that of heparin in the active plastin trombo test (aPTT) when sulfated chitosan and sulfated sodium alginate were mixed at a weight ratio of 1:1.

Keywords : *sulfated chitosan, anticoagulation.*

1. 서론

혈액에는 응고인자가 많이 있으며 여러 요인으로 인하여 응고인자가 활성화되어 응고기전에 의해 지혈이 되게 된다.[1] 혈액 항응고제는 혈액의 응고기전 중 어느 단계를 차단하여 혈액이 응고되지 못하게 하는 물질이다. 이 혈액 항응고제는 심근경색증, 뇌경색증 환자에게 투여하여 응고를 억제하고 있으며,[2-4] 혈액검사 시 혈액이 응고되면 안되는 검사 등에 사용된다. 이러한 혈액 항응고제로는 시트르산 소듐, 옥살산 소듐, EDTA, 헤파린 등이 있다.[5] 이 중에서 앞의 3가지는 칼슘 이온과 결합하여 항응고 효과를 나타며 헤파린은 주로 혈액의 응고기전 중에서 내인성 경로의 프로트롬빈 활성인자 형성을 억제하여 트롬빈 생성을 억제하거나 이미 형성된 트롬빈의 저해제인 antithrombin Ⅲ 또는 heparin cofactor Ⅱ의 활성을 증가시킴으로써 매우 강력한 항응고 활성을 나타낸다.[6,7] 현재 혈액의 항응고제로 가장 널리 사용되고 있는 헤파린은 항응고 활성은 우수하나, 가격이

비싸다는 단점을 가지고 있다.[8] 따라서 천연 다당류를 이용하여 유사 헤파린을 제조하고 항응고활성을 시험하여 항응고제를 개발하는 연구가 이루어져 왔다.[9-16] 일반적으로 다당류의 기능성은 분자량에 의해 영향을 받으며, 특히 항응고활성과 생리활성은 분자량에 따라 현저한 차이가 나타나는 것으로 알려져 있다.[16]

본 연구에서는 분자량에 따라 항응고성이 다르다는 점에 착안하여 다른 저분자화된 키토산과 알진산 나트륨을 황산화하였으며 Lee-White 법에[17] 의한 혈전의 응고시간을 비교·평가하였다. 또한 혈액 응고기전에 미치는 주된 효과로 응고인자 Xa와 트롬빈에 대한 antithrombin III의 효과를 알아보기 위해 고유 혈장과 항응고제가 첨가된 혈장의 응고시간을 측정하여 혈액의 항응고활성을 시험하였다.

2. 실험

시약. 본 연구에 사용된 천연 다당류인 알진산 나트륨 (sodium alginate : Chembio Co., LTD., Korea)은 분자량이 3.2×10^4, 1.21×10^4, 0.78×10^4 Da인 것을 구입하여 사용하였으며 저분자 키토산 (Chitosan : Chembio CO., LTD., Korea)도 분자량이 5.23×10^4, 2.15×10^4, 0.85×10^4 Da을 구입하여 사용하였고, 황산화 반응에 사용된 삼산화황-피리딘 복합체 (Aldrich)는 특급시약을 사용하였다.

N,N-Dimethylacetamide(DMAc, Sinyo Pure Chem Co., LTD, Japan)는 10% NaOH 수용액으로 세척 후 질소기류하에 감압증류하여 -5 ℃에서 냉장 보관한 상태에서 사용하였다. 헤파린 (Heparin: M_v 8000, Aldrich)은 특급 시약을 구입한 그대로 사용하였으며, 혈장은 사람의 혈장을 충북대학병원 혈액분석실에서 제공받아 사용하였다.

키토산 및 알진산 나트륨의 황산화. 3구 플라스크에 키토산 1.5 g을 100 mL DMAc 용액에 가하여 25 ℃로 조절된 water bath상에서 2시간 동안 교반하여 팽윤시킨 후, 삼산화황-피리딘 복합체 (C_5H_5N-SO_3)를 키토산 또는 알진산 나트륨의 글루코스 단위에 대하여 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7의 몰비율로 조절하여 서서히 첨가하고, 75 ℃에서 5시간 동안 가열하여 반응시켰다. 반응 종결 후, 증류수로 희석하고 1 N NaOH 수용액으로 중화시킨 다음 미반응물을 걸러내었다. 생성물인 여액을 염을 제거하기 위하여 셀로판 튜브를 이용하여 2~3일 동안 투석하고 아세톤에 재침전하여 황산화 키토산 및 알진산 나트륨을 얻었다.

제조된 황산화 키토산 및 황산화 알진산 나트륨의 구조를 확인하기 위하여 FT-IR 분광계 (Jasco FT/IR-300E)를 사용하여 적외선 스펙트럼을 조사하였으며, 황산화물의 황산화도는 원소분석기 (EA 1110, USA)를 사용하여 측정하였다.

응고혈액의 표면관찰. 항응고제의 종류 (황산화 키토산, 황산화 알진산 나트륨, 헤파린)에 따라 항응고 정도를 비교 관찰하였으며 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 분자량 및 황산화 키토산/황산화 알진산 나트륨 혼합물의 무게비율 (1 : 1, 3 : 7, 7 : 3)에 따른 응고정도를 광학현미경 (KONTRON Electronic., USA)으로 관찰하였다. 정맥혈액 1 mL을 슬라이드 글라스 위에 떨어뜨리고, 0.4% 항응고제 수용액을 각각 50 mg 씩 첨가하여 10분 또는 30분이 경과한 후 응고 표면을 관찰하였다.

혈액의 항응고성 실험. Lee-White 법으로 항응고제가 첨가되지 않은 혈액과 헤파린, 황산화 키토산 그리고 황산화 알진산 나트륨이 첨가된 혈액에 대한 항응고 실험을 행하였다. 시험관을 37 ℃로 유지하고 정맥으로부터 채혈된 혈액 3 mL를 주사기내로 흡입할 때 주사기에 혈액이 들어오기 시작하면 초시계를 작동시킨다. 채혈은 3개의 시험관에 1 mL씩 관벽에 대고 흘려 넣은 후 시험관을 37 ℃ 항온수조에 옮겨 놓고 3분 동안 방치한 다음, 30초마다 시험관을 꺼내 약 45°로 기울여서 혈액의 유동성을 관찰하였다. 유동하고 있으면 본래대로 되돌려 놓고 시간이 경과한 후 거꾸로 해도 혈액이 흘러나오지 않으면 응고 종료로 간주하고 그 시간을 측정하였다.

활성 트롬보플라스틴 시간 측정 (aPTT). 인위적으로 접촉인자를 미리 활성화시켜 두면 내인계 응고기구에 의해서 적어도 제VII인자 및 제IX인자 활성을 정확하게 측정할 수 있을 것이라는 가정 하에 실험하였다. aPTT 시약을 37 ℃로 가온시켜 두고 3.8% 시트릭산 나트륨 용액과 혈전의 비율이 1 : 9 (v/v)가 되도록 섞은 혈액을 원심분리하여 혈장을 얻었다. 혈장 0.1 mL를 시험관에 넣고 다시 aPTT 시약 0.1 mL를 가한 후, 37 ℃로 조절된 항온조 속에서 5~7분 동안 방치하여 접촉인자를 활성화시켰다. 헤파린과 황산화 키토산, 황산화 알진산 나트륨의 농도를 각각 0.03%로 동일하게 하고, 37 ℃에서 혈장에 대해 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06%의 농도가 되도록 제조한 후 가온된 0.025 M 염화칼슘 용액을 0.1 mL를 넣고 동시에 초시계로 응고시간을 측정하였다. 이렇게 측정된 시간을 활성 트롬보플라스틴 시간 (aPTT)으로 하였다.

3. 결과 및 토론

황산화 키토산 및 황산화 알진산 나트륨의 합성. 황산화 키토산 및 황산화 알진산 나트륨의 FT-IR 스펙트

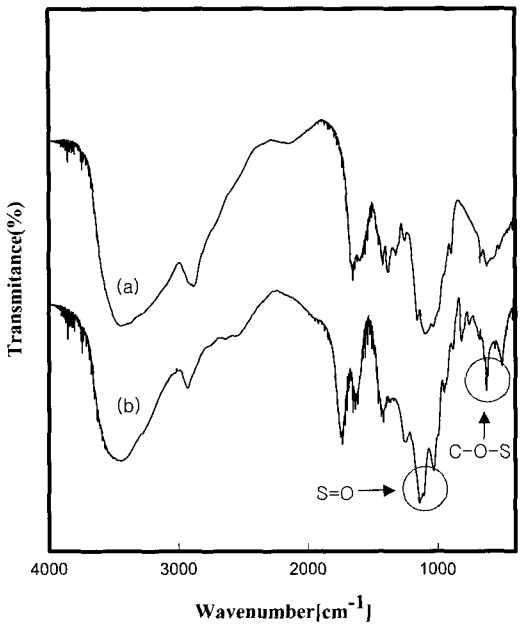

Figure 1. FT-IR spectra of (a) chitosan and (b) sulfated chitosan.

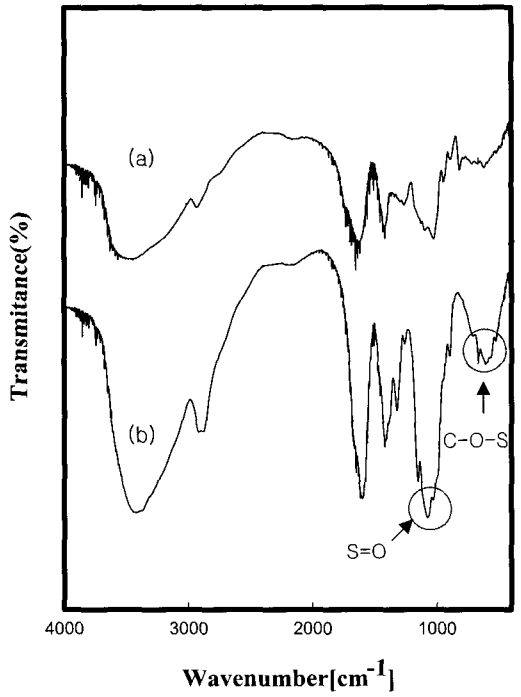

Figure 2. FT-IR spectra of (a) sodium alginate and (b) sulfated sodium alginate.

라를 Figure 1과 2에 나타내었다. 키토산과 알진산 나트륨에서는 나타나지 않던 황산화 키토산 및 황산화 알진산 나트륨의 특성피크인 S=O 결합의 흡수가 1260 cm^{-1}에서, C-O-S 결합의 흡수가 706 cm^{-1}에서 나타난 것으로 보아 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨이 합성되었음을 확인하였다.

Table 1. Synthesis of Sulfated Chitosan and Sulfated Sodium Alginate

sample	M_v^a($\times 10^4$)	polysaccharides unit/ SO_3-Pyridine complex (mol/mol)	temp.(℃)	DS[b]
SC-1	0.85	1 : 1	75	1.68
SC-2		1 : 3		1.82
SC-3		1 : 5		2.75
SC-4		1 : 7		2.64
SC-5	5.23	1 : 5	75	1.74
SC-6	3.56			1.70
SC-7	1.15			1.84
SA-1	0.78	1 : 1	75	1.84
SA-2		1 : 3		1.91
SA-3		1 : 5		2.53
SA-4		1 : 7		2.21
SA-5	5.22	1 : 5	75	1.54
SA-6	3.43			1.69
SA-7	1.21			1.84

SC : Sulfated chitosan, SA : Sulfated sodium alginate.
[a]Determined by Mark-Houwink method(25 ℃).
[b]Degree of sulfation(DS) per glucose unit was calculated by elemental analysis.

황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 황산화도는 Table 1에 나타내었다. 동일한 분자량을 갖는 키토산 또는 알진산 나트륨에 대한 삼산화황-피리딘 복합체의 몰비율을 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5, 1 : 7로 각각 변화시키며 황산화 반응시킨 결과, 몰비율이 1 : 5일 때 황산화도가 각각 2.75, 2.53으로 가장 높았으며, 삼산화황-피리딘 복합체의 비율이 더 높은 1 : 7일 경우에 오히려 2.64, 2.21로 약간 저하됨을 알 수 있었다. 또한 분자량에 따른 황산화도를 조사해 본 결과, 분자량이 감소할수록 황산화도가 증가했으며 가장 분자량이 낮은 8.5×10^3 Da 및 7.8×10^3 Da일 때 황산화도가 2.75와 2.53으로 가장 높았다. 이것은 키토산 및 알진산 나트륨의 분자량이 작을수록 용매에 대한 팽윤성이 증가하기 때문이라고 생각한다.

혈액의 항응고성. 헤파린과 황산화된 키토산 및 황산화된 알진산 나트륨의 혈액응고 정도를 광학현미경을 이용하여 표면을 관찰하였다. 37 ℃로 조절된 건조기 안에 각각의 항응고제를 0.4 wt%로 증류수에 녹이고, 슬라이드 글라스 위에 있는 정맥혈 1 mL에 각각 0.05 g 씩 떨어뜨려 섞어준 후, 10분이 경과된 시간을 기준으로 혈액 응고 정도를 관찰하였다.[16]

항응고제가 첨가되지 않았을 경우, 10분이 지난 상태에서 혈액의 응고가 심하게 일어났다. 그러나 헤파린

과 황산화 키토산 (8.5×10^3) 그리고 황산화 알진산 나트륨 (7.8×10^3)을 첨가한 정맥혈액에는 Figure 3에서 보는 바와 같이 응고되는 정도가 현저히 낮음을 알 수 있었다.

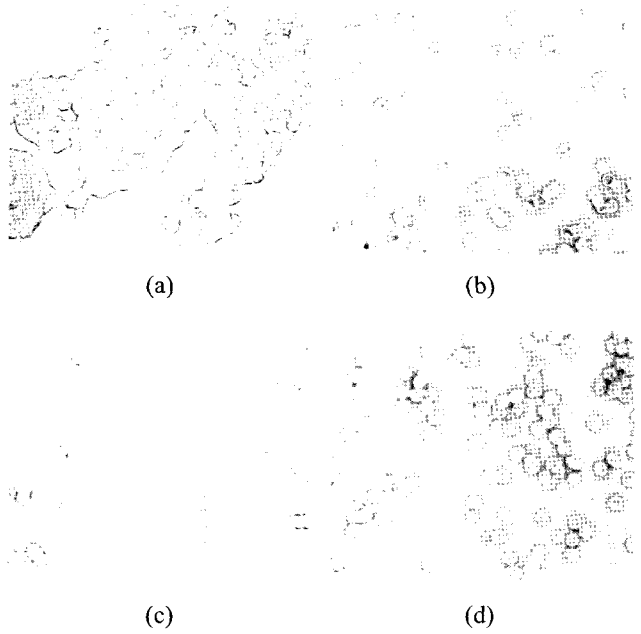

Figure 3. Surface photographs of blood coagulation by diffent anticoagulants. (a) Blank (b) Heparin (c) Sulfated sodium alginate(7.8×10^3 Da), and (d) Sulfated chitosan (8.5×10^3 Da).

황산화된 키토산의 분자량에 따른 혈액 응고 정도를 시각적으로 관찰한 바는 Figure 4에 나타내었다. 앞서 혈액 응고 표면을 관찰한 실험과 같은 조건으로 분자량은 각각 8.5×10^3, 1.1×10^4, 3.5×10^4, 5.5×10^4 Da인 것을 사용하여 실험하였다. 광학현미경사진에서 볼 수 있듯이, 분자량이 5.5×10^4 Da인 경우와 8.5×10^3 Da인 경우를 비교하였을 때 응고된 정도를 시각적으로 확인할 수 있으며 분자량이 8.5×10^3 Da일 경우에 항응고 효과가 더욱 우수함을 알 수 있다. 이는 헤파린에서 알려진 바와[17] 마찬가지로 분자량이 저분자일수록 혈액 응고 기전에 있어 혈액의 항응고성도 우수함을 보여 주는 것이다. 황산화 알진산 나트륨도 분자량에 따라 같은 결과를 보여주었다.

황산화 키토산 (M_v : 8.0×10^3 Da)과 황산화 알진산 나트륨 (M_v : 7.8×10^3 Da)의 무게비율을 각각 3 : 7, 7 : 3, 1 : 1로 혼합하여 혈액 응고성을 관찰한 결과는 Figure 5에 나타내었다. 앞에서와 같이 30분이 경과된 시간을 기준으로 혈액 응고 정도를 관찰하였다.

광학현미경사진을 비교하였을 때 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 무게비율이 1 : 1인 경우가 7 : 3과 3 : 7의 경우보다 현저하게 혈액 응고 활성이 큰 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 황산화된 두 다당류의 혼합물이 헤파린과 유사한 분자구조를 형성하여

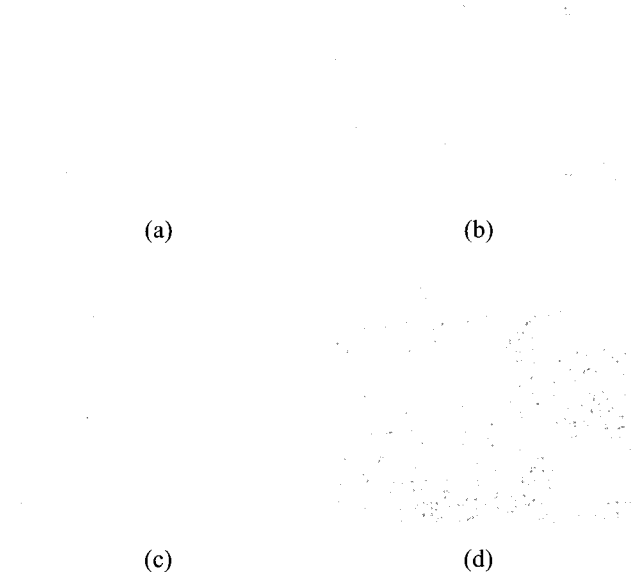

Figure 4. Surface photographs of blood coagulation by different molecular weight of sulfated chitosan : (a) 8.5×10^3 Da (SC-2), (b) 1.15×10^4 Da (SC-7), (c) 3.56×10^4 Da (SC-6), and (d) 5.5×10^4 Da (SC-5).

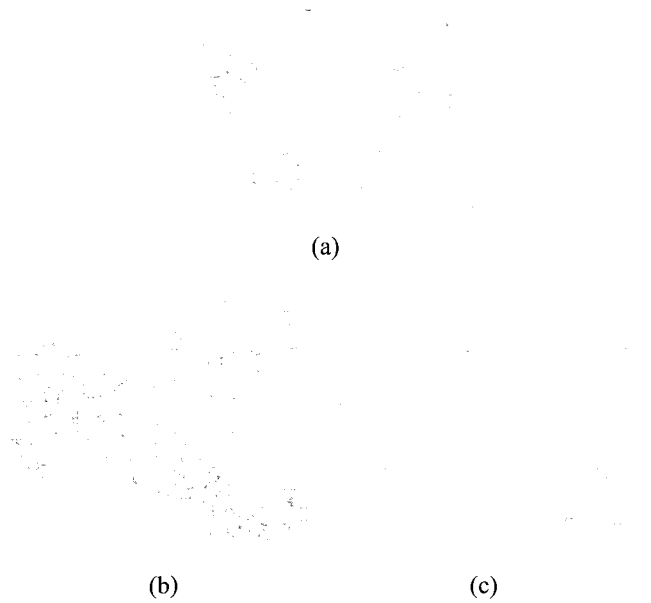

Figure 5. Surface photographs of blood coagulation on weight ratio of SC-3/SA-3: (a) 7 : 3, (b) 3 : 7, and (c) 1 : 1.

혈액의 항응고성이 증가하는 경향을 나타내는 것으로 생각된다.

Lee-White 법으로[18] 항응고성을 측정하기 위하여 시험관 속에 들어있는 1 mL 정맥혈액에 가장 항응고성이 좋을 것으로 예상되는 황산화 키토산 (SC-3, M_v : 8.5×10^3 Da)과 황산화 알진산 나트륨 (SA-3, M_v : 7.8×10^3 Da) 그리고 헤파린 (M_v : 8.0×10^3 Da)을 0.4 wt% 수용액으로 제조하여 각각 0.1 g씩 첨가한 후 37 ℃에서 혈액이 완전히 응고된 시간을 조사한 결과를 Figure 6에 나타내었다. 순수 혈장의 경우에는 응고 시간이 637초였으며, 황산화된 키토산과 황산화 알진산 나트륨은 응고 시간이 각각 3034초, 2900초이었다. 이는 응고 시간이 5792초인 헤파린과 비교하였을 때, 50% 정도의 항응고 효과를 나타냄을 확인하였다.

같은 방법으로 순수 혈액, 혼합비율 (1 : 1, 3 : 7, 7 : 3)의 황산화 키토산 (SC-3, M_v : 8.5×10^3 Da)과 황산화 알진산 나트륨 (SA-3, M_v : 7.8×10^3 Da) 그리고 헤파린 0.4

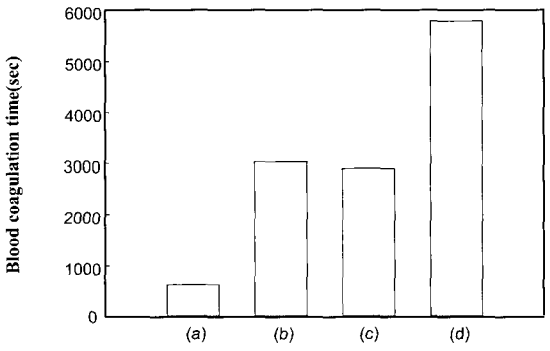

Figure 6. Blood coagulation time by Lee-White method : (a) Blank, (b) Sulfated chitosan(M_v : 8.5×10^3 Da), (c) Sulfated sodium alginate(M_v : 7.8×10^3 Da), and (d) Heparin(M_v : 8.0×10^3 Da).

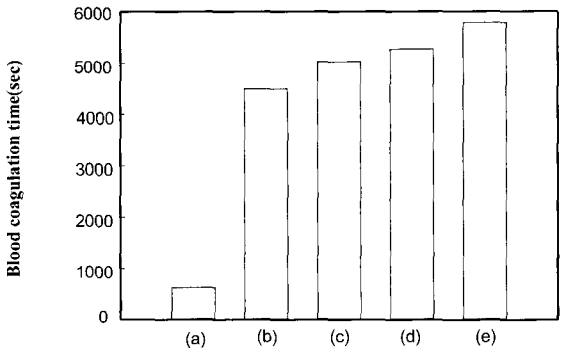

Figure 7. Blood coagulation time by Lee-White method : (a) Blank, (b) SC-3/SA-3 = 3/7(w/w), (c) SC-3/SA-3=7/3(w/w) (d) SC-3/SA-3=1/1(w/w), and (e) Heparin(M_v : 8.0×10^3 Da).

wt% 수용액을 0.1g씩 첨가하여 37 ℃에서 혈액이 완전히 응고되는 시간을 조사한 결과를 Figure 7에 나타내었다. 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨 혼합물의 무게비가 3 : 7일 경우 4504초, 7 : 3일 경우 5029초, 1 : 1일 경우 5282초로 각각 측정되었으며, 1 : 1일 경우 헤파린과 비교하였을 때 응고 시간을 기준으로 91% 정도로 가장 좋은 항응고 활성을 나타내었다. 이 같은 현상는 황산화된 두 혼합다당류의 구조가 헤파린과 유사한 분자구조를 가지기 때문에 비교적 좋은 항응고 활성을 나타내는 것으로 해석할 수 있다.

황산화된 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 응고활성을 헤파린과 비교하기 위해 같은 조건에서 처리한 후, aPTT를 측정하였다. Figure 8은 혈액 응고 시간이 가장 길었던 황산화 키토산 (SC-3, M_v : 8.5×10^3 Da)과 황산화 알진산 나트륨 (SA-3, M_v : 7.8×10^3 Da)의 무게비율이 1:1인 혼합물의 농도를 변화시키면서 aPTT를 헤파린과 비교하였다. 헤파린과 황산화 키토산/황산화 알진산 나트륨의 1 : 1 (w/w) 혼합용액의 농도를 각가 0.03 %로 동일하게 하고, 37 ℃에서 농도를 혈장에 대해 0, 0.01, 0.02, 0.04, 0.06%의 농도가 되도록 만들어 측정하였다. 항응고제가 첨가되지 않은 순수 혈장의 평균 aPTT는 32.4초였으며, 0.06%의 헤파린은 107.8초를 나타내었고, 황산화 알진산 나트륨과 키토산의 1 : 1 혼합물은 같은 농도인 0.06%에서 91.2초이었다. 이는 헤파린의 aPTT에 대해 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 혼합물 (1 : 1)은 84.6% 정도의 효과를 나타내고 있음을 확인하였다. 이는 황산화된 알진산 나트륨과 키토산의 혼합물은 혈액의 응고 기전에서 내인계 경로의 응고인자 (제 XI, XI, IX, VII 인자)의 활성에 많은 영향을 미치고

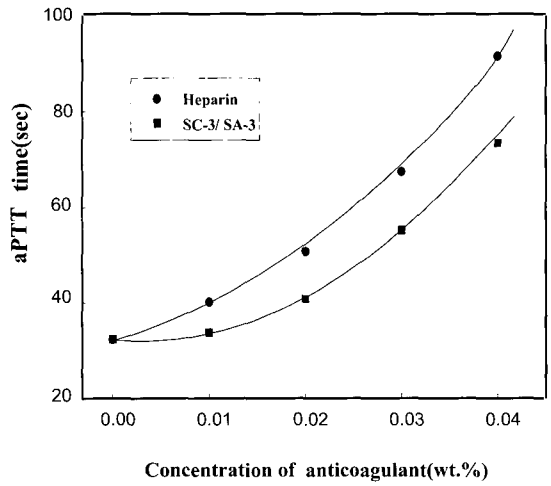

Figure 8. aPTT on different concentration of anticoagulant of SA-3/SC-3(1:1) mixture.

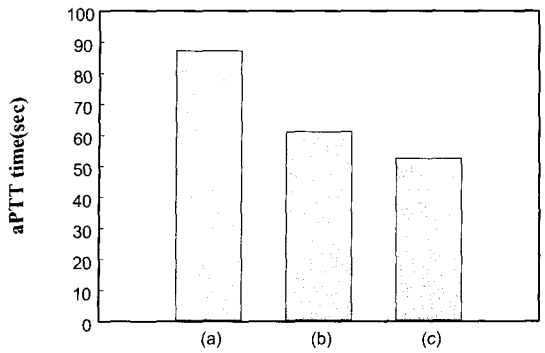

Figure 9. aPTT with weight ratio of sulfated alginate(SA-3) / sulfated chitosan(SC-3):(a) 1 : 1, (b) 3 : 7, and (c) 7 : 3.

있다는 것을 말해준다.

황산화 알진산 나트륨과 황산화 키토산의 무게비율에 따른 aPTT를 Figure 9에 나타내었다. Lee-White법에서와 마찬가지로 aPTT 시험에서도 혼합물의 무게비율이 1 : 1일 경우에 87.3초로 무게비율이 3 : 7이나 7 : 3일 때 각각 61.2초, 52.6초에 비하여 높은 값을 나타내었다. 이는 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨 혼합물의 구조가 헤파린과 비슷하기 때문에 우수한 항응고 활성을 나타내는 것으로 사료된다.

4. 결론

저분자 키토산과 저분자 알진산 나트륨을 삼산화황-피리딘 복합체와 반응시켜 황산화 키토산과 황산화 제조한 황산화 알진산 나트륨을 제조하였으며 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 혈액 항응고성을 시험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1) 저분자 키토산과 저분자 알진산 나트륨의 황산화 반응에서 삼산화황-피리딘 복합체/다당류의 무게비율이 1 : 5일 때 황산화도가 각각 2.75와 2.53으로 가장 큰 값을 나타내었다.

2) 황산화 키토산과 황산화 알진산 나트륨의 분자량에 따른 항응고 효과를 관찰한 결과 분자량이 8.5×10^3 Da, 7.8×10^3 Da인 경우에 혈액의 항응고 효과가 가장 우수하였다.

3) 황산화 키토산 (M_v : 8.5×10^3 Da)과 황산화 알진산 나트륨 (M_v : 7.8×10^3 Da)을 1 : 1 무게비율로 혼합하였을 때, 항응고 활성이 가장 좋았으며, 헤파린과 비교하였을 때, 91%정도의 항응고 활성을 나타내었다.

4) 혈액응고 기전에 대한 aPTT 시험에서 황산화 키토산 (M_v : 8.5×10^3 Da)과 황산화 알진산 나트륨 (M_v : 7.8×10^3 Da)의 무게비율이 1:1일 경우 87.3초로 가장 높았으며, 헤파린과 항응고 활성을 비교하였을 때 84% 정도를 나타내었다.

References

1. M. J. Craog, *Ann. Rev. Biochem.*, **49,** 765 (1995).
2. P. Morowitz, *The Chemistry of Blood Coagulation. Springfield*, IL, Charles C Thomas, 1968.
3. L. Richard, and M. D. Mueller, *Heparin Circulaton*, **89**, 432 (1994).
4. H. Jack, and F.Valentiv, *Heparin Circulation*, **89**, 520 (1994).
5. J. R. Lieberman and W. H. Geerts, *J Bone Joint Surg*, **76-A,** 1239 (1994).
6. L. B. Jaques, *Science*, **206**, 528 (1978).
7. A. A. Lorner, *Heparin Chemistry and Clinical Usage*, Academic, NY, p 1218 (1979).
8. T. Kumada and Y. Abiko, *Thromb. Res.*, **24**, 285 (1981).
9. Y. S. Yun, K. S. Kim, and Y. N. Lee, *J. Chitin and Chitosan*, **4**, 8 (1999).
10. R. A. A. Muzzarelli, C. Lough, and M. Emanuelli, *Cabohydr. Res.*, **164**, 433 (1987).
11. K. Fujiki, H. Matsuyama, and T. Yano, *J. Fish Diseases*, **17**, 349 (1994).
12. D. A. Flanagan, C. J. Palenik, J. C. Setcos, and C. H. Miller, *Dental Materials*, **14**, 399 (1998).
13. S. Hirano, M. Tanaka, M. Hasegawa, K. Tobetto, and A. Nishioka, *Carbohydr. Res.*, **137**, 205 (1985).
14. K. Nagasawa. H. Uchiyama, and N. Wajima, *Carbohydr. Res.*,**158**, 183 (1986).
15. I. B. Cushing, R. V. Davis, E. J. Kratovil, and D. W. MacCorquodale, *J. Am. Chem. Soc.*, **76,** 4590 (1954).
16. C. W. Lee, S. I. Moon, and Y. K. Hong, *Polymer(Korea)*, **25**(3), 385 (2001).
17. T. Takeuchi, K. Murata, and I. Kusakaba, *Nippon Shokuhin Gakkaishi*, **41**, 505 (1994).
18. R. I. Lee and D. D. White, *J. Am. Med. Sci.*, **145**, 495 (1913).